

PCT/JP 2004/012516

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

02.09.2004

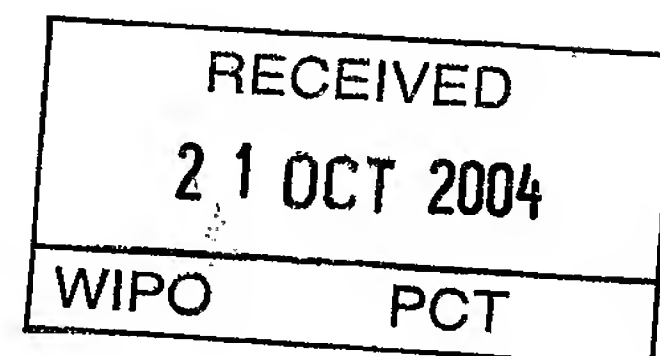
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 2 月 2 7 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 5 2 9 5 2  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 4 - 0 5 2 9 5 2 ]

出 願 人  
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構

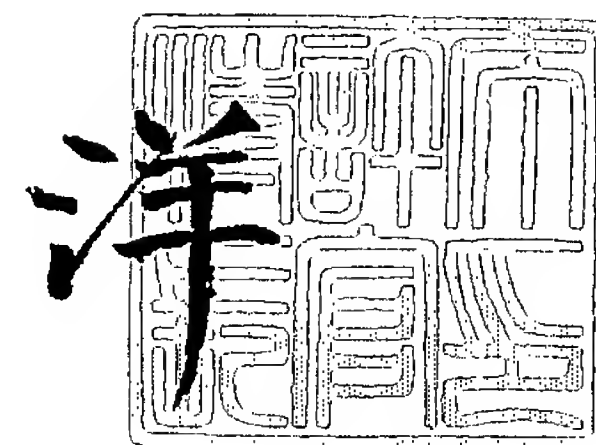


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 0 8 1 1

【書類名】 特許願  
【整理番号】 JP4672JST  
【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特許出願  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A01H 1/06  
C12N 1/16  
C12N 15/01

【発明者】  
    【住所又は居所】 埼玉県さいたま市浦和区領家 7 - 2 0 - 1 6 ( 6 - 5 0 3 )  
    【氏名】 井上 弘一

【特許出願人】  
    【識別番号】 503360115  
    【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構

【代理人】  
    【識別番号】 100109726  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 園田 吉隆

【選任した代理人】  
    【識別番号】 100101199  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小林 義教

【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 058621  
    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

以下の (a) ~ (b) ;

(a) 非相同組換えに必要な遺伝子の機能低下もしくは機能喪失を誘導した細胞を作製する段階、

(b) 前記細胞に外来性 DNA を導入し相同組換えを行わせる段階、  
を含むことを特徴とする相同組換えを行わせる方法。

## 【請求項 2】

前記非相同組換えに必要な遺伝子の機能低下もしくは機能喪失が、細胞内に内在する非相同組換えに必要な遺伝子中に突然変異または欠失を導入することで達成されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記非相同組換えに必要な遺伝子の機能低下もしくは機能喪失が、細胞内に内在する非相同組換えに必要な遺伝子の全体を破壊することで達成されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法

## 【請求項 4】

前記外来性 DNA を導入する段階が、電気ショック法、スフェロプラスト法または T i プラスミド法のいずれかの方法によって達成されることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記非相同組換えに必要な遺伝子が、少なくとも K U 7 0、K U 8 0、L i g I V、D N A - P K c s、または X R C C 4 からなる群から選択される遺伝子であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記細胞が真核細胞であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記真核細胞が、少なくとも動物細胞、植物細胞、真菌細胞からなる群から選択される細胞であることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記真菌細胞が、糸状菌であることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記糸状菌が、ニューロスポラ属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、フザリウム属、トリコデルマ属またはムコール属のいずれか 1 つに属する糸状菌である請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 1 0】

前記ニューロスポラ属に属する糸状菌が、少なくともニューロスポラ・クラッサ、ニューロスポラ・シトフィラ、ニューロスポラ・テトラスペルマ、ニューロスポラ・インターメディア、ニューロスポラ・ディスクレータからなる群から選択される 1 種である請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 1 1】

前記段階 (a) で作製された請求項 1 に記載の細胞。

## 【請求項 1 2】

請求項 1 乃至 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法によって取得された細胞。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 相同組換えを行わせる方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、効率よく相同組換えを行わせる方法、およびその方法によって取得された相同組換え体細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

これまでに、真核生物細胞では、主な2つの組換え経路、相同組換え、および非相同組換えによる経路が同定されている。相同組換えは、DNAの相同な配列間における相互作用により誘起されるのに対し、非相同組換えは、DNAの相同性とは無関係に、切断された二重鎖端の直接的なライゲーションにより引き起こされると考えられている。出芽酵母では、組換えの機構として、主に相同組換えのシステムが使用されており、外来DNAがその両端に組込む相手のゲノム配列の一部を有していれば、その配列と相同なゲノム部位に外来DNAが組み込まれる (Takataら, 1997、Wachら, 1994)。この過程において、RAD51、RAD52、RAD54が必須であることが報告されている (NickoloffおよびHoekstra, 1998)。一方、ヒト、植物、昆虫および分裂酵母を含む他の多くの生物は、組換えの機能として非相同組換えのシステムを主として利用している。これらの生物においては、外来DNAがたとえゲノム上の特定領域と相同な長いDNA配列部分を有していたとしても、当該特定領域に組み込まれる頻度は低く、ゲノム上の不特定部分に組み込まれる場合が多い。

【0003】

相同組換えは、既存の遺伝子を効率よく改変することが可能であり、新種株の作出や、細胞の機能低下を改善するなどの目的に利用することができるため、出芽酵母を除く真核生物細胞において、相同組換え率を上昇させる試みがこれまでに数多く行われてきた。

例えば、出芽酵母の相同組換えにおいて重要な役割を果たしている、RAD51遺伝子あるいはRAD52遺伝子またはそのホモログ遺伝子の高発現系を構築する試みがなされているが、RAD51あるいはRAD52を高発現させても相同組換え頻度は2～3倍程度しか上昇せず、むしろ、細胞に対して悪影響を及ぼすことが知られている (YanezおよびPorter, 2002、Reissら, 2000)。また、導入するベクターの相同組換え率を増大させるために多様なターゲティングベクターが開発されてきた。例えば、哺乳類細胞や植物細胞における、ネガティブ・ポジティブ選択法による相同組換え個体濃縮法 (特許文献1、非特許文献1、2を参照のこと) は、代表的な例であるが、このような方法によっても依然として相同組換え頻度は極めて低く (1%以下)、かつ、このような方法を実施すること自体煩雑な操作が必要であることから、実用的な方法ではなかった。

【0004】

出芽酵母以外の真核生物細胞における遺伝子組換えの研究は、遺伝学的アプローチが容易に行えることから、分裂酵母の他、真菌、例えば、糸状菌などを用いて行われている。糸状菌であるニューロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) も組換え研究に多く用いられる生物の一つである。ニューロスポラ・クラッサの*mei-3*、*mus-11*、*mus-25*遺伝子は、出芽酵母の相同組換えにおいて機能するRAD51、RAD52およびRAD54とそれぞれ、相同であることが知られている。そこで、これらの遺伝子に欠損をもつ変異体の相同組換え率に関し、プラスミドpMTR (Schroederら, 1995) に含まれる*mt r*遺伝子の、染色体*mt r*遺伝子座への組換え頻度を指標にして、検討された (Handaら, 2000)。これらの遺伝子に欠損を持たない野生型株においては、形質転換体の3から5%のみが相同組換えを示したのに対し、*mei-3*および*mus-25*変異体では、相同組換えはほとんど起こらなかった。これらのデータからも、ニューロスポラ・クラッサにおいては相同組換え率が非常に低く、遺伝子ターゲティングにより特定の遺伝子を破壊することは容易ではないことが示されていた。

【0005】



一方、非相同組換えの過程は、DNA依存性プロテインキナーゼ（DNA-PKcs）、Ku70-Ku80ヘテロダイマー、DNAリガーゼIV-Xrcc4複合体を介して進行することが報告されている（非特許文献3、4、5を参照のこと）。そこで、発明者は、非相同組換え機構を阻害することによって、相同組換え率が増大するのではないかとの作業仮説に基づき研究を進めた。

#### 【0006】

【特許文献1】特開2001-046053号公報

【非特許文献1】Teradaら, Nature biotech. 20, 1030-1034. 2002

【非特許文献2】Jeannotteら, EJ. Mol. Cell Biol. 11, 5578-5585. 1991

【非特許文献3】Gallegoら, The Plant Journal, 35, 557-565 2003

【非特許文献4】Walkerら, Nature 412, 607-614. 2001

【非特許文献5】CritchlowおよびJackson, TIBS, 23, 394-398. 1998

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

本発明者は、上記事情に鑑み、真核細胞における相同組換え率を上昇させる方法がないかについて鋭意研究を行った結果、意外にも非相同組換えに必要な遺伝子であるKU70、KU80の機能を喪失もしくは機能低下させることで、真核細胞における相同組換え頻度を上昇させることができることを見出した。

よって、本発明は、相同組換え率を上昇させる方法を提供することを目的とする。

さらに、上記方法を用いて作出された高効率相同組換え細胞を提供することも目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

しかして、本発明において、相同組換え率を上昇させるために、非相同組換えに必要なことが知られている遺伝子に、突然変異導入、遺伝子破壊などの手法により機能低下、機能喪失を引き起こし、次いで、相同組換えを起こさせたい所望の外来DNAを該細胞に導入することで、効率よく相同組換えを行わせる方法が提供される。

本発明の方法を用いて実現される相同組換えの効率は、例えば、70%以上、より好ましくは80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上であり、最も好ましくは100%の相同組換え頻度が実現される。

本発明で用いられる細胞は、一般に、真核細胞であれば組織由来の細胞であっても、株化培養細胞であってもよく、限定はしないが、相同組換え率の低い、動物細胞、植物細胞、真菌細胞などが適している。

動物細胞としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ヒツジ、ネコ、イヌなどの哺乳類細胞の他、鳥類、は虫類、両生類などの細胞であっても使用可能である。

また、植物細胞としては、例えば、イネ、ダイズ、コムギ、オオムギ、ライムギ、綿花、トウモロコシ、イモ、ピーナッツ、アラビドプシスが適している。

さらに、遺伝子操作が比較的容易な真菌細胞なども使用可能であり、糸状菌細胞などが好ましい。使用可能な糸状菌としては、ニューロスポラ属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、フザリウム属、トリコデルマ属またはムコール属などを挙げることができる。中でも好適な糸状菌としては、ニューロスポラ属に含まれるニューロスポラ・クラッサ、ニューロスポラ・シトフィーラ、ニューロスポラ・テトラスペルマ、ニューロスポラ・イン

ターメジアなど、また、アスペルギルス属に含まれるアスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ソーヤ、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・アワモリ、アスペルギルス・カワチ、アスペルギルス・パラシテイク、アスペルギルス・フラバス、アスペルギルス・ノミウス、アスペルギルス・フミガタス、アスペルギルス・ニジュランスなどが好適に使用可能である。

#### 【0009】

本発明に使用される非相同組換えに必要な遺伝子は、当該技術分野において知られているものであれば使用可能であり、限定はしないが、DNA依存性プロテインキナーゼ（DNA-PKcs）、Ku70-Ku80ヘテロダイマー、DNAリガーゼI V-Xrcc4複合体などをコードする遺伝子が好ましく、特に、KU70遺伝子および／またはKU80遺伝子が最も好ましい。

本発明で用いられるKU70、KU80には、任意の真核生物のKU70およびKU80ホモログが含まれる。例えば、ヒトKU70（P12956）（配列番号1）、ヒトKU80（P13010）（配列番号2）、ニューロスポラ・クラッサのKU70（NCU0829.0.1）（配列番号3）、KU80（NCU00077.1）（配列番号4）などを含む遺伝子、およびこれらの遺伝子産物の一または数個のアミノ酸に欠失、付加もしくは置換を含むアミノ酸配列をコードする遺伝子であって、その産物が非相同組換えに必要な活性を有するものが本発明のKU70ホモログ、KU80ホモログとして使用可能である。

#### 【0010】

本発明で使用される細胞へのDNAの導入方法は、当該技術分野において周知の方法であれば使用可能であるが、例えば、スフェロプラスト法、電気ショック法（エレクトロポレーション法）、リン酸カルシウム法、カチオン性脂質による方法などが利用可能であるが、電気ショック法（エレクトロポレーション法）がもっとも好ましい。

#### 【0011】

また、本発明による方法によって作製された、相同組換え率が顕著に上昇した細胞も、本発明により提供される。

#### 【発明の効果】

#### 【0012】

本発明により、対象の細胞において、ほぼ100%の相同組換え頻度を達成することができるため、目的の遺伝子の破壊、置換等を効率よく行うことができる。さらに、異種生物の遺伝子を対象の細胞のゲノムの特定域に挿入し、発現させることが可能となる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0013】

1. 対象の細胞における非相同組換えに必要な因子をコードする遺伝子の同定

本発明においては、非相同組換えに必要な因子をコードする遺伝子に機能低下または機能喪失を導入するために、対象とする細胞に由来する非相同組換えに必要な因子をコードする遺伝子を同定する必要がある。例えば、KU70またはKU80のホモログを同定する場合、対象とする細胞由来のKU70またはKU80のホモログの遺伝子配列が公知でない場合は、公知の他の種、例えば、ヒトなどのKU70（配列番号1）またはKU80（配列番号2）のホモログ遺伝子配列を基にして、対象細胞のcDNAライブラリーなどに対してスクリーニングを行う。スクリーニングの方法としては、核酸ハイブリダイゼーション及びクローニングに関する技術分野において周知の方法を用いて、低い、中程度又は高い緊縮性のハイブリダイゼーションにより得ることができる。ハイブリダイゼーションの「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な条件である。当業者であれば、ホモログを同定するためのハイブリダイゼーションスクリーニングを行うにあたり、プローブの長さなどを考慮して、温度、イオン強度等を如何に調節するか容易に理解することができる。

#### 【0014】

さらに、対象とする細胞由来のORFのデータベースが存在する場合には、該データベースに対してBLASTサーチ等を行い既知のKU70またはKU80に対するホモ

ログを同定することも可能である。この場合、検索された配列に基づいて該当する遺伝子全体を増幅するために適当なPCR用のプライマーを作製し、得られたPCR産物を適当なクローニング用のベクターに挿入することによって、目的のKU70またはKU80をクローン化させることも可能である。

同定されたKU70またはKU80は適当なクローニング用ベクター（例えば、pUC19など）にサブクローニングして配列確認を行う。

#### 【0015】

### 2. 非相同組換えに必要な遺伝子の機能低下または機能喪失

本発明は、細胞に内在する非相同組換えに必要な遺伝子の機能低下または機能喪失させることにより、染色体上における相同組換え頻度を上昇させる方法を提供するものである。そのために、細胞に内在する非相同組換えに必要な遺伝子の機能改変することができる。該機能を改変する方法としては、限定はしないが、例えば、内在する非相同組換えに必要な遺伝子に突然変異を導入する方法、RNA干渉（RNAi）を利用する方法、非相同組換えに必要な遺伝子全体を破壊する方法、非相同組換えに必要な遺伝子に対するアンチセンスを細胞内に導入する方法等、当業者にとって周知の方法が使用可能である。好ましくは、非相同組換えに必要な遺伝子に突然変異を導入する方法、RNA干渉（RNAi）を利用する方法、または非相同組換えに必要な遺伝子全体を破壊する方法であり、より好ましくは、RNA干渉（RNAi）を利用する方法、非相同組換えに必要な遺伝子全体を破壊する方法があり、最も好ましくは、非相同組換えに必要な遺伝子全体を破壊する方法である。

#### 【0016】

遺伝子全体を破壊する方法にはクローン化した標的遺伝子の必須領域にマーカー遺伝子を挿入したDNAを細胞に形質転換する方法がある。細胞内に導入されたDNAは標的遺伝子の両隣接配列を介した相同組換えを誘発し染色体上の標的遺伝子をマーカー遺伝子により破壊することができる（Alfaら、1993）。

また、遺伝子機能の喪失の目的において、RNA干渉（RNAi）を利用する。この場合、機能喪失を引き起こすべき目的の因子の機能ドメインに関する塩基配列をもとに、短いRNA二本鎖もしくは該RNAを産生するベクターを細胞内に導入することで、当該因子の機能低下または機能喪失をもたらすことができる。

また、インビトロにおいて突然変異を導入する方法としては、部位特異的突然変異導入法、及びPCR突然変異導入法などの当該技術分野において既知の方法を用いて行うことができる。部位特異的突然変異導入法（Carter, 1986; ZollerおよびSmith, 1987）、カセット突然変異導入法、限定的選択突然変異導入法（Wellsら、1985）または他の既知の技術は、目的の遺伝子に変異を導入するために調製され、クローン化されたDNA上で実施することができる（Ausbelら、1987; Sambrook, 1989）。

KU70またはKU80に突然変異を導入することで機能改変を行う場合、Ku70タンパク質またはKu80タンパク質活性を欠失させるように変異を導入すること、またはKu70タンパク質とKu80タンパク質が相互作用を行うのに必要な部位に変異を導入し該相互作用を消失させるような変異を導入することなどが望ましい。

#### 【0017】

### 3. 組換え活性の測定

相同組換えの程度は、細胞外から導入したDNAにより形質転換された細胞のうち、相同配列部位での組換えによって形質転換をおこしているものの割合で測定する。

#### 【0018】

以下に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0019】

### ニューロスポラ・クラッサ

#### 1. 実験材料

表1に、本実験で用いたニューロスポラ株を示す。C1-T10-37AおよびC1-



T10-28aを野生型として用いた (TamuraおよびInoue, 1989)。大腸菌株DH1およびXL-1Blueはプラスミドの増幅に用いた (Sambrookら, 1989)。

プラスミドpBlescript SK<sup>+</sup> (Stratagene社) およびpGEM (Promega社) は、通常、新しいベクターの構築に用いた。2つのプラスミドpBARGEM7-1 (PallおよびBrunelli, 1993)、pCSN43 (Stabenら, 1989) および2つのコスミドG7H3, G8B12はFungal Genetics Stock Center, University of Kansas Medical School, Kansas City, KS 66160-7420から入手した。

# 【0020】

表1. 本発明において用いられるニューロスポラ・クラッサ株

【表1】

株	遺伝子型	出所／文献
C1-T10-37A	<i>A</i>	研究室のストック
C1-T10-28a	<i>a</i>	研究室のストック
54yo-728-5	<i>A ncku70</i>	本実験で作製
54yo-728-7	<i>a ncku70</i>	本実験で作製
54yo-828-3	<i>A ncku80</i>	本実験で作製
54yo-828-4	<i>a nku80</i>	本実験で作製
FGSC#2764	<i>A mei-3</i>	FGSC*
FGSC#6409	<i>A mus-11</i>	FGSC*

FGSC\*: Fungal Genetics Stock Center

# 【0021】

## 2. 方法

### (1) ニューロスポラにおける遺伝子研究法

遺伝子解析はDavisおよびde Serres (1970) の記載に従って行った。

### (2) PCR法

PCR増幅はExpand<sup>TM</sup> High-Fidelity PCR system (Roche Diagnostics Corp., Switzerland) を用いて指示書に従って行った。

# 【0022】

(3) H y g<sup>r</sup> 遺伝子によるニューロスポラ・クラッサのKUホモログ遺伝子 (以下、n c K U 7 0 遺伝子および n c K U 8 0 と記述する) の置換を行うためのプラスミド構築

ハイグロマイシン耐性遺伝子 H y g<sup>r</sup> による n c K U 7 0 および n c K U 8 0 の置換方法を図1Aおよび1Bに示す。

### (a) n c K U 7 0 の置換のためのDNAの調製

ニューロスポラ K U 7 0 遺伝子の各2 k b p の5' および3' フランキングDNAを、コスミドG7H3をテンプレートに用いてPCRにより増幅した (PCRの条件は: 94℃2分のあと94℃15秒、58℃30秒、72℃2分のサイクルを10回、さらに94℃15秒、58℃15秒、72℃2分 (サイクルごとに72℃の時間を5秒ずつ増やしていく) を20サイクル、さらに72℃7分、その後4℃で保存)。

5' フランキングDNAのプライマー

(p-1) 5' GTGCTGTAGCCGTTTGGGTATCGC3' (配列番号5)

(p-2) 5' GGCGTAATAGCGAAGAGATAGTTGCTGGAAATAA3' (配列番号6)



3' フランキングDNAのプライマー

(p-3) 5' AAGCATAAAGTGTAAGGCTTGTTGATGACCGT

3' (配列番号7)

(p-4) 5' TTGGACGCCGCACACCTCTCGCTCT3' (配列番号8)

【0023】

次に、Hyg<sup>r</sup> 遺伝子プラスミド pCSN43 をテンプレートとして用いてPCR増幅を行った(条件は上記と同じ)。

(p-5) 5' TTATTTCCAGCAACTATCTCTTCGCTATTACGCC3' (配列番号9)

(p-6) 5' CACGGTCAATCAACAAGCCTTTACACTTTATGCTT3' (配列番号10)

【0024】

上記3つのPCR産物を混合して融合PCRテンプレートとして用い(Kuwayamaら, 2002)、また、プライマーとして、(p-1) (配列番号5) 及び (p-4) (配列番号8) を用いて、融合PCRを以下の条件下で行った;

94℃2分、94℃15秒、60℃30秒、68℃5分を10サイクル、94℃15秒、60℃30秒、68℃5分(1サイクルごとに68℃の時間を1分ずつ延長する)を20サイクル、72℃7分、4℃で保持。

得られた融合PCR産物を0.7%のアガロースゲルで電気泳動したのち、野生型のニューロスポラに形質転換した。

【0025】

(b) ncKU80 の置換のためのDNAの調製

ニューロスポラ KU80 の各2kbpの5' および3' フランキングDNAをコスミド G8B12 をテンプレートに用いてPCRにより増幅した(条件は ncKU70 の場合と同じ)。

5' フランキングDNAのプライマー

(p-7) 5' GCGCCGGGAGGTTGTTTCGTAAGCTG3' (配列番号11)

(p-8) 5' GGCGTAATAGCGAAGAGGCTTTTCGGCTTTGCTG3' (配列番号12)

3' フランキングDNAのプライマー

(p-9) 5' AAGCATAAAGTGTAAGCAGGGTTGGAGACAGGT3' (配列番号13)

(p-10) 5' AAGGCGGAGTTGTTGGCTGCGAAGG3' (配列番号14)

【0026】

次に、Hyg<sup>r</sup> 遺伝子プラスミド pCSN43 をテンプレートとして用いてPCR増幅を行った(条件は ncKU70 の場合と同じ)。

(p-11) 5' CAGCAAAGCCGAAAAGCCTCTTCGCTATTACGCC3' (配列番号15)

(p-12) 5' ACCTGTCTCCAACCCCTGCTTTACACTTTATGCTTT3' (配列番号16)

【0027】

融合PCRは(p-7) (配列番号11) および (p-10) (配列番号14) を用いて、上記条件下と同様に行った。

【0028】

(4) 電気ショック法(エレクトロポレーション法)

分生子懸濁液は1Mソルビトール中  $2.0 \times 10^9$  濃度で調製した。融合PCR産物、 $30 \mu\text{l}$  を分生子懸濁液  $50 \mu\text{l}$  と混合し、氷上にて5分間インキュベートした。混合液

40  $\mu$ l エレクトロポレーター (BTX Electro Cell Manipulation 600 Genetronics Inc.) 上の細胞へ添加した。電気ショックの条件を以下のようにして行った; チャージ電圧 1.5 kV、最高電圧/計時モード 2.5 kV/抵抗、計時キャパシタンス 50  $\mu$ F、計時抵抗 R6 (186 オーム)。

#### 【0029】

##### (5) ncKU70 および ncKU80 の置換

電気ショックの後、1.2% スクロースを含有する Vogels' 最小培地 1 ml を加え、30°C で 2 時間 インキュベートした。この溶液 200  $\mu$ l をハイグロマイシン B (500  $\mu$ g/ml) を含む寒天培地に塗り広げた。ハイグロマイシン耐性のコロニーを単離し、標的遺伝子座において置換が生じているかどうかを PCR を用いて検討した。さらに、余分な Hyg<sup>r</sup> 遺伝子コピーを含んでいるかどうか、サザンブロット法により確認した。

##### (6) 変異原感受性

UV 及びメチルメタンスルホン酸塩 (MMS) に対する感受性について既刊の文献に記載の方法に従って行った (Inoue および Ishii, 1984)。

#### 【0030】

### 3. 結果

##### (1) ncKU70 および ncKU80 の置換実験

ヒト KU70 および KU80 に対するニューロスポラ・クラッサスのホモログを見つけるために、ニューロスポラゲノムデータベース (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora>) に対してサーチを行った。検索された候補遺伝子を仮に ncKU70 および ncKU80 と名づけた。ncKU70 および ncKU80 遺伝子は各々 645 および 661 アミノ酸をコードする。図 2 には、ヒト Ku70 のアミノ酸配列と ncKu70 のアミノ酸配列の比較を示す。ヒト Ku70 と ncKu70 は 23% の同一性、42% の類似性を有していた。図 3 には、ヒト Ku80 と ncKu80 の比較を示す。ヒト Ku80 と ncKu80 は 23% の同一性、41% の類似性を有していた。Orbach/Sachs コスミドライブラリー (Orbach, 1994) から得た G7H3 及び G8B12 は、各々 ncKU70 および ncKU80 を含んでいる。従って、これらのコスミドをテンプレートとして用い、ncKU70 および ncKU80 の PCR 増幅を行った。材料および方法のところで記載したように、ncku 遺伝子に由来する 2 kbp の 5' および 3' フランキング DNA を結合した Hyg<sup>r</sup> 遺伝子を保持する DNA 断片は、融合 PCR によって調製した。融合 PCR 産物を野生型ニューロスポラ・クラッサの中に導入し、ハイグロマイシン耐性コロニーを単離した。約 200 の形質転換体をサブクローニングして、ゲノム DNA を抽出し、ncKU 遺伝子が Hyg<sup>r</sup> 遺伝子によって置換されているかどうかを PCR によって決定した。この PCR のプライマーは、図 1B に示されるように、一方を ncKU 遺伝子の外側に、他方を Hyg<sup>r</sup> 遺伝子の内側に設定した。ハイグロマイシン耐性コロニーの約 10% が ncKU 遺伝子の位置に Hyg<sup>r</sup> 遺伝子を有していた。ncKU70 :: Hyg<sup>r</sup> を保持する 54 y o - 728 株 および ncku80 :: Hyg<sup>r</sup> を保持する 54 y o - 828 株 を各々 ncku70 および ncku80 変異体として用いた。これら株は、栄養生長およびホモ接合交雑増殖は正常であるが、僅かに UV に感受性であり、明らかに MMS に感受性であった (図 4)。

#### 【0031】

##### (2) 野生型、ncku70、ncku80、mei-3、mus-11 変異株における mt r 遺伝子および ad-3A 遺伝子のターゲティング

染色体 IV および I 上の mt r 遺伝子および ad-3A 遺伝子を、置換実験の標的に選んだ。mt r 遺伝子に欠損を持つ変異体は、アミノ酸アナログである p-フルオロフェニルアラニン (PFP) に耐性を示す。ad-3A 遺伝子に欠損を持つ変異体は、紫色の色素の蓄積を示す (The Neurospora Compendium, Academic Press 2001 を参照のこと)。mt r ORF または ad-3A ORF をプラスミドサイジン耐性遺伝子 bar に置換することによってターゲティングベクターを構築した。bar 遺伝子を含有する 2.7 kb DNA を pBARGEM7-1 から制限酵素 ScaI および SmaI で切り出した。

## (2) - 1

m t r 遺伝子の場合、ターゲティングベクターの構築および導入は以下のように行った。m t r 遺伝子を含む p M T R を M s c I で消化し、m t r 遺伝子のプロモーターと O R F の一部を含んだ約 1 k b p を除去した。次いで、2.7 k b p の b a r 断片をその部分に挿入して、プラスミド p G S 1 (9.5 k b p) を作製した。p G S 1 を N o t I で消化し、その結果得られた b a r 遺伝子の両サイドに m t r 遺伝子の 1.8 k b p 5' および 1.9 k b p 3' フランキング DNA を保持した 6.7 k b p の直鎖状断片を異なる遺伝的バックグラウンドを持つ株にエレクトロポレーション法により導入した。ブラストサイジン (200  $\mu$ g/ml) に耐性をもつ形質転換体を単離し、それらが P F P (20  $\mu$ g/ml) に耐性であるかどうか検討した。b a r-DNA が m t r 遺伝子座に組換えられていれば、P F P に対して耐性を示すはずである。そこで、組換えが相同的置換によって行われたかどうかをさらに検討した。表 2 は、野生型株においてブラストサイジン耐性形質転換体のうち 10 から 30 % が相同組換えにより生じたことを示す。これに対し、n c k u 7 0 および n c k u 8 0 株の形質転換体全てが相同的組換えによって生じた。相同組換え修復に欠損を持つ m e i - 3 および m u s 1 1 株では、相同的組み込みがほとんど起こらなかった。

【0032】

【表 2】

株	実験番号	Bla-耐性	PFP-耐性	相同組換え頻度 (%)
野生型	1	9	3	
	2	22	3	
	3	11	3	
	4	16	2	
	総数	58	11	19
<i>ncku70</i>	1	41	41	
	2	18	18	
	総数	59	59	100
<i>ncku80</i>	1	12	12	
	2	23	23	
	3	12	12	
	4	26	26	
	総数	73	73	100
<i>mei-3</i>	1	58	2	
	2	35	1	
	総数	93	3	3*
<i>mus-11</i>	1	45	0	
	2	20	0	
	総数	65	0	0

## 【0033】

(2) - 2

*ad-3A* の 1.6 kbp 5' および 2 kbp 3' フランキング DNA を *bar* 遺伝子の両サイドに保持する *ad-3A* ターゲティングベクターの構築は、上述の *mt r* 遺伝子の場合と同様に行い、種々の株に導入した。ブラストサイジン耐性の形質転換体を単離し、アデニンを添加した最小培地中 10 日間サブカルチャーを行った。*ad-3A* の機能を喪失したことを示す、紫色の菌糸体のコロニー数をカウントした。表 3 に示すように、野生型のブラストサイジン耐性形質転換体の約 50% が紫色の菌糸体であり、これに対し、*ncku70* および *ncku80* 株の形質転換体では 100% が紫色を呈していた。これらの形質転換体が相同的置換による破壊株であることを PCR により確認した (表 3)。

## 【0034】



【表 3】

株	Bla-耐性	アデニン要求性	相同組換え頻度 (%)
野生型	86	44	51
<i>ncku70</i>	46	46	100
<i>ncku80</i>	36	36	100

## 【0035】

## 4. ターゲティング率と相同配列の長さとの関係

ターゲティング率と相同配列の長さとの関係を調べるために、*mt r* 遺伝子の 5' および 3' フランキング DNA と相同な 50, 100, 500, 1000 bps を PCR で増幅し、*bar* 遺伝子の両サイドに結合させた。ブラストサイジン耐性形質転換体について、PFP に対し耐性であるかどうか調べた (表 4)。50 bp および 100 bp 長の相同 DNA を導入されたブラストサイジン耐性形質転換体は、*ncku70*、*ncku80* ならびに野生型株において PFP 耐性をほとんど示さなかった。500 bp 長の相同性の場合、野生型株において PFP 耐性を示したブラストサイジン耐性形質転換体が 10% 未満であるのに対し、*ncku70* および *ncku80* 株においては 90% 以上が PFP 耐性を示した。1000 bp 長の相同性の場合、野生型株において PFP 耐性を示したブラストサイジン耐性形質転換体が 20% 未満であるのに対し、*ncku70* および *ncku80* 株においては全てが PFP 耐性を示した。従って、相同部分が少なくとも 1000 bp 長あれば標的遺伝子を完全に置換することができる。

## 【0036】

【表 4】

株	相同配列の長さ	実験番号	Bla-耐性	PPF-耐性	相同組換え頻度 (%)
野生型	50bp	1	22	0	
		2	29	1	
		総数	51	1	2
ncku70	50bp	1	30	0	
		2	29	1	
		総数	59	1	2
ncku80	50bp	1	29	0	
		2	30	0	
		総数	59	0	0
野生型	100bp	1	20	0	
		2	30	1	
		総数	50	1	2
ncku70	100bp	1	8	2	
		2	13	0	
		総数	21	2	10
ncku80	100bp	1	14	0	
		2	32	2	
		総数	46	2	4
野生型	500bp	1	40	4	
		2	40	3	
		総数	80	7	9
ncku70	500bp	1	40	35	
		2	39	37	
		総数	79	72	91
ncku80	500bp	1	30	28	
		2	39	36	
		総数	69	64	93
野生型	1,000bp	1	9	3	
		2	22	7	
		3	40	6	
		4	40	7	
		総数	111	23	21
ncku70	1,000bp	1	4	4	
		2	8	8	
		3	10	10	
		4	8	8	
		総数	30	30	100
ncku80	1,000bp	1	31	31	
		2	19	19	
		総数	50	50	100

## 【実施例 2】

## 【0037】

アスペルギルス1. アスペルギルス・ニジュランスの KU70 遺伝子のクローニング

アスペルギルス・ニジュランス のゲノムデータベース (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/index.html>) に対して BLAST ネットワークサービスを用いて、ニューロスポラ・クラッサの KU70 遺伝子と相同性の高いクローン情報を検索した。その結果、Contig 1.132 は アスペルギルス・ニジュランスの KU70 遺伝子全長を含んでいると考えられた。アスペルギルス・ニジュランスの推定 Ku タンパク質は、ニューロスポラ・クラッサの Ku70 タンパク質と約 50% の相同性を示した。A. nidulans FGCS A89 株のゲノム DNA を鋳型に以下のプライマーを用いて PCR により、KU70 遺伝子全長を含む 4045 bp の断片を増幅した。

KU70 / F o r 5' G A G A A C T G A T C A T G C G A T G C G T G G C 3' (配列番号 17)

KU70 / R e v 5' C A T T C G C T T G A T C G A C A T G G T T G G C 3' (配列番号 18)

## 【0038】

ゲノム DNA	1 (50 ng)
プライマー F o r w a r d	1 (100 pmol)
プライマー R e v e r s e	1 (100 pmol)
10×反応用バッファー	5
d N T P 混合物	4
E x T a q	1
DDW (蒸留水)	37
総量	50 $\mu$ l

上記のような反応系を作製し、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL (宝酒造 (株)) にて PCR 反応を行った。反応条件は、96℃ 2分、1サイクル; 96℃ 30秒、58℃ 30秒、72℃ 7分、30サイクルとした。PCR 反応後、アガロースゲル電気泳動に供し、目的断片をゲルから回収した。これを p G E M - T E a s y ベクター (Promega 社) に TA クローニング法によりライゲーションを行い、p G E M k u 7 0 を得た。

## 【0039】

2. アスペルギルス・ニジュランスの KU70 遺伝子破壊—o l i C 3 1—

p G E M k u 7 0 を鋳型に以下のプライマーを用いて QuikChange site-directed mutagenesis (部位特異的突然変異導入法) 法により H i n d I I I サイトを導入した。下線部は H i n d I I I サイトを示す。

KU70 (H i n d I I I) / F o r 5' C A C A T T G T C C A A G C T T A C T G T G G C T A C C C 3' (配列番号 19)

KU70 (H i n d I I I) / R e v 5' G G G T A G C C A C A G T A A G C T T G G A C A A T G T G 3' (配列番号 20)

## 【0040】

p G E M k u 7 0	2 (20 ng)
プライマー F o r w a r d	2 (200 ng)
プライマー R e v e r s e	2 (200 ng)
10×反応用バッファー	5
d N T P 混合物	4
P f u T u r b o	1
DDW (蒸留水)	34
総量	50 $\mu$ l

TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL を用いて、95℃ 2分、1サイクル; 95℃ 3

0 秒、54℃30 秒、70℃15 分、18 サイクルとした。得られた変異プラスミドを pGEMku70 (H) とし、このプラスミドを BlnI と HindIII で消化し、アスペルギルス・ニジュランス由来オリゴマイシン耐性遺伝子 o1iC31 を BlnI と HindIII で消化した断片を挿入し、pGEMku70::o1iC31 とした。このプラスミドを ApaI 消化によって直鎖状にした後、A. nidulans FGSC A89 株にプロトプラスト PEG 法を用いて導入した。形質転換体の選択は、オリゴマイシン (3 μg/ml) を含むポテトデキストロース培地で行った。得られた形質転換体について、PCR 及びサザンブロット解析により KU70 遺伝子破壊株を選抜した。

#### 【0041】

#### 3. アスペルギルス・ニジュランスの KU70 遺伝子破壊 - p

pGEMku70 を鋳型に以下のプライマーを用いて QuikChange site-directed mutagenesis 法により HindIII サイトを導入した。下線部は HindIII サイトを示す。

KU70 (HindIII) / For 5' CACATTGTCCAAGCTTACT GTGGCTACCC 3' (配列番号 21)

KU70 (HindIII) / Rev 5' GGGTAGCCACAGTAAGCTT GGACAATGTG 3' (配列番号 22)

#### 【0042】

pGEMku70	2 (20 ng)
プライマー Forward	2 (200 ng)
プライマー Reverse	2 (200 ng)
10×反応用バッファー	5
dNTP 混合物	4
Pfu Turbo	1
DDW (蒸留水)	34
総量	50 μl

TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL を用いて、95℃2 分、1 サイクル；95℃30 秒、54℃30 秒、70℃15 分、18 サイクルとした。得られた変異プラスミドを pGEMku70 (H) とし、このプラスミドを BlnI と HindIII で消化し、アスペルギルス・オリゼ由来ピリチアミン耐性遺伝子 p

#### 【0043】

#### 4. 任意遺伝子の破壊効率 - kexB -

野生株あるいは ku70 破壊株を宿主にした遺伝子破壊効率を調べるにあたり、kexB 遺伝子破壊によって効率を求めた。kexB 遺伝子はプロセッシングプロテアーゼ KexB をコードしており、kexB 遺伝子破壊株は野生株と比較してコンパクトなコロニーを形成することが分かっている。野生株と ku70 破壊株に kexB 遺伝子破壊用プラスミドを導入し、得られた形質転換体がどのくらいの割合で kexB 遺伝子破壊株の表現型を示すかどうか調べた結果を以下に示した。

#### kexB 遺伝子破壊効率

野生株 (FGSC A89) 宿主 6 / 83 形質転換体 (7.2%)

ku70 遺伝子破壊株宿主 90 / 100 形質転換体 (90%)

このように非常に高い効率で kexB 遺伝子を破壊することに成功したことから、ku70 遺伝子破壊株は遺伝子破壊などの遺伝学的解析において非常に有用株であることが示された。

#### 【実施例 3】



## 【 0 0 4 4 】

## アラビドプシス

## 1. 実験材料

表 5 に本実験で用いるアラビドプシス株を示す。

標的遺伝子はどのようなものでもよいが、今回は、A G (At4G18960) 及び L F Y (At5g61850) とする。形質転換マーカーとして、プラスミド CaMV 35S-sGFP (S65T)-NOS 3' 由来の G F P 遺伝子を用いる。プラスミドから、HindIII と EcoRI で G F P 遺伝子を切り出し、平滑末端化して pBlue-script SK<sup>+</sup> の EcoRV 部位に挿入する (pSKGFP)。制限酵素部位をつけたプライマーで A G 遺伝子の読み出しコドン上流約 2 kb を増幅し、pSKGFP の GFP 上流に挿入する。同様に A G 遺伝子読み出しコドンの下流約 2 kb も GFP 下流に挿入する。このようにして得られた pSKAG::GFP から A G::GFP 部分を切り出して形質転換に使用する。L F Y 遺伝子についても同様の操作を行う。

## 【 0 0 4 5 】

## 【表 5】

破壊されて いる遺伝子	GenBank 登録番号	ストック株名	Nottingham ストック番号	ホモログ名
<b>At1g16970</b>	<b>BH750130</b>	<b>SALK 037071</b>	<b>N537071</b>	<b>K70-1</b>
	<b>BZ378077</b>	<b>SALK 106654</b>	<b>N606654</b>	<b>K70-2</b>
	<b>BZ292117</b>	<b>SALK 123114</b>	<b>N623114</b>	<b>K70-6</b>
	<b>BH750124</b>	<b>SALK 037064</b>	<b>N537064</b>	<b>K70-3</b>
<b>At1g48050</b>	<b>BH814153</b>	<b>SALK 065823</b>	<b>N565823</b>	<b>K80-1</b>
	<b>BZ762137</b>	<b>SALK 089730</b>	<b>N589730</b>	<b>K80-2</b>
	<b>BH814138</b>	<b>SALK 065799</b>	<b>N565799</b>	<b>K80-4</b>
	<b>BH254483</b>	<b>SALK 016627</b>	<b>N516627</b>	<b>K80-3</b>
<b>At5g57160</b>	<b>BH864398</b>	<b>SALK 095962</b>	<b>N595962</b>	<b>L4-1</b>
	<b>BH754746</b>	<b>SALK 044027</b>	<b>N544027</b>	<b>L4-2</b>

## 【 0 0 4 6 】

## 2. 遺伝子ホモ破壊株の確認

(1) 各系統の種子を 5 % 次亜塩素酸で滅菌し、ハイポネックスとショ糖を加えた寒天培地に播種する。

(2) 10 日後、子葉を一枚切り取りトミー精工社マイクロスマッシュにて DNA を分離する。その DNA を鋳型にし、T-DNA 挿入部位前後のゲノム DNA 500 ベースに合わせたプライマーで PCR を行う。ゲノム DNA の増幅が見られなかった個体をとりあえず遺伝子破壊ホモ個体として以後の実験に使用する。

## 【 0 0 4 7 】

## 3. KU 及び Lig 4 破壊株の維持

ホモ破壊株と確認された個体は定法に従って栽培し、系統維持する。

## 【 0 0 4 8 】

## 4. 細胞培養系の確立と形質転換

(1) 播種後 2 週間の幼植物 (前述の方法で育てた無菌のもの) から胚軸と葉を切り取り、1 mm 程度の幅に切り刻む。

(2) カルス誘導培地 (CIM 培地: B5 培地に MES、糖、固化剤、植物ホルモンを加えたもの) に置床する。

(3) カルスが十分に成長したら、液体培地 (MS 培地: MS 基本培地に糖、植物ホルモ

ンを加えたもの)に移し振とう培養する。

(4) 一週間ごとに植え替える。

(5) 細かいカルスを直接形質転換に使用する。(塊が大きい場合はプロトプラスト化して後述の5.に記載の手法を用いる。)

(6) カルスを遠心で集め、EPバッファー (70 mM KCL, 0.3 M マニトール, 5 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid, pH 5.8) に懸濁する。濃度を  $1.5 \times 10^6$  /ml に調整する。800  $\mu$ l を電気穿孔用キュベット (4 mm ギャップ) に入れる。BTX社 ECM 600 を使用し、モード: LV、キャパシタンス: 125  $\mu$ F、抵抗: 0、チャージ電圧: 300 ボルト、フィールド強度: 750 V/cm、パルス長: 22-26 msec の条件で電気穿孔を行う。DNA は一度の穿孔に 10  $\mu$ g を使用する。

(7) 穿孔後、0.5 M マニトールを加えた液体培地 5 ml に懸濁し、1 時間静置する。

(8) 液体培地に寒天を入れ固化したシャーレ培地に播く。

#### 【0049】

#### 5. プロトプラストの作製と形質転換

(1) 種後2週間の幼植物 (前述の方法で育てた無菌のもの) から胚軸と葉を切り取り、1 mm 程度の幅に切り刻む。

(2) 0.5 M マニトール溶液に1時間浸潤した後、酵素溶液 (1% セルラーゼ Onozuka RS、0.25% マセロザイム R-10、0.5 M マニトール、8 mM 塩化カルシウム、pH 5.5) で5-10時間処理し、0.5 M マニトールで3回洗浄する。

(3) 細胞数を  $2 \times 10^6$  /ml に調整し、400  $\mu$ l を電気穿孔用キュベット (2 mm ギャップ) に入れる。導入するDNAを5-10  $\mu$ g/ml となるよう加える。BTX社 ECM 600 を使用し、モード: LV、キャパシタンス: 500  $\mu$ F、抵抗: R3 (48 オーム)、チャージ電圧: 106 ボルト、フィールド強度: 530 V/cm、パルス長: 22-26 msec の条件で電気穿孔を行う。

(4) 穿孔後、修正8p培地3mlに懸濁し、1時間静置する。

(5) 修正8p培地をアガロースで固めた培地に広げ、培養する。

#### 【0050】

#### 6. 形質転換体の確認

(1) 形質転換実験後に生育したカルスに紫外線を照射する。

(2) GFP発現が認められた細胞塊を一つずつ分けて、植え替える。

(3) 細胞塊が5 mm ぐらいに成長したら2つに分け、一方は再分化用培地 (RIM: B5培地にMES、糖、植物ホルモンを加えたもの) に移し、もう一方からDNAを分離する。DNA分離の方法は実験1と同様である。得られたDNAを鋳型として、GFP 遺伝子内部と標的遺伝子部位に設定したプライマーでPCRを行う。予定サイズの断片が出現した細胞塊は、遺伝子が破壊されたものと数える。

#### 【0051】

#### 7. アグロバクテリウムを利用した形質転換

(1) TiベクターpBI221Hを制限酵素処理し、35Sプロモーター: GUS構造遺伝子: NOSターミネーター部分を切り出す。

(2) 切り出した部分に上記の形質転換用DNAを挿入し、エレクトロポレーションでアグロバクテリウムに導入する。アンピシリン耐性で目的のプラスミドをもつアグロバクテリウムを選択する。

(3) 形質転換用DNAを持つアグロバクテリウムを28℃で一晩培養した後、浸潤用懸濁培地にOD600が0.8になるよう懸濁する。

(4) 植物体を使用する場合は、鉢を逆さにし、花芽部分を15分間浸す。その後約1ヶ月培養し、種子を集める。集めた種子を発芽させ、GFPによる発光が見られるものについてPCRによる確認を行う。

(5) カルスを使用する場合は、菌懸濁液に2-3分浸した後共存培養培地 (N6CO培

地)で3日間培養する。カルベニシリンで滅菌した後GFP発光の有無について調査する。発光部分のみを植物ホルモンを含むMS培地で1ヶ月培養し、再度発光を確認した後、DNAを分離しPCRによる確認を行う。

#### 【0052】

#### 8. その他の形質転換実験

直鎖化された形質転換用DNAは、パーティクルガンによる形質転換及びプロトプラストを利用する細胞融合形質転換にも使用される。

#### 【実施例4】

#### 【0053】

#### ヒトKU70遺伝子の破壊について

#### 1. ヒトKU70遺伝子情報の取得

Ensemblプロジェクト (<http://www.ensembl.org/>) のヒトゲノムデータベースよりヒトKU70 (G22P1) 遺伝子の塩基配列およびエキソン、イントロンなどの情報を[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview?gene=ENSG00000100419](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000100419)より取得した。

#### 【0054】

#### 2. 繰り返し配列位置の特定

得られた塩基配列情報をREPEATMASKER WEB SERVER (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>) に送り、繰り返し配列の検索を行い、KU70遺伝子内に存在する繰り返し配列の位置を特定した。

#### 【0055】

#### 3. ターゲッティングベクター用プライマーの設定

1および2の塩基配列情報をもとにターゲッティングベクターに用いるホモロジーアーム作製用PCRプライマーの設定を行った。以下にプライマー配列を示す。(下線部は、サブクロニング用の制限酵素認識配列)

#### (1) ポリAセレクション法ベクター構築の場合

#### 5' 側ホモロジーアーム用プライマー対

Ku70 P2 AscI 5' - GCTATAGGCGCGCCTCTGCATTTA  
AGGAGAGAA TAGCTGTG - 3' (配列番号23)

Ku70 P3 NotI 5' - AGAACAGCGGCCCGCAAGAGATCTC  
GATCACTGCTTATGATC - 3' (配列番号24)

#### 3' 側ホモロジーアーム用プライマー対

Ku70 P4 NotI 5' - CTTTAGGCGGCCCGCAATTCAAGAT  
GAGTCATAAGAGGATC - 3' (配列番号25)

Ku70 P5 SalI 5' - CATGTCGACATTTCAAGACAGGTG  
AAGAGGTGACAAAG - 3' (配列番号26)

#### (2) プロモーターレス法ベクター構築の場合

#### 5' 側ホモロジーアーム用プライマー対

Ku70 P2 SalI 5' - GCTATAGTCTGACTCTGCATTTAAG  
GAGAGAA TAGCTGTG - 3' (配列番号27)

Ku70 P3 NotI 5' - AGAACAGCGGCCCGCAAGAGATCTC  
GATCACTGCTTATGATC - 3' (配列番号28)

#### 3' 側ホモロジーアーム用プライマー対

Ku70 P4 NotI 5' - CTTTAGGCGGCCCGCAATTCAAGAT  
GAGTCATAAGAGGATC - 3' (配列番号29)

Ku70 P5 SalI 5' - ATCGCAGGCGCGCCAGACAGGTGA  
AGAGGTGACAAAGATAC - 3' (配列番号30)

#### 【0056】

#### 4. PCR法によるホモロジーアームの合成

#### (1) 材料および使用機器

ヒト大腸癌由来HCT116 genomic DNA (500 ng/μl)  
 KOD-Plus (東洋紡績株式会社製の熱耐性DNA Polymerase)  
 PCR用サーマルサイクラー (TaKaRa Thermal Cycler MP,  
 Model No. TP-3000 宝酒造株式会社)  
 それぞれのプライマー対を各々10 pmolに調整したPrimer Mix (上記3  
 を参照)

#### PCR反応液の組成

HCT116 ゲノムDNA (500 ng/μl)	1 μl
10x PCR buffer for KOD-Plus	5 μl
2mM dNTPs	5 μl
25mM MgSO <sub>4</sub>	2 μl
Primer mix (10 pmol各)	1.5 μl
DMSO	2.5 μl
KOD-Plus-DNAポリメラーゼ	1 μl
滅菌水	32 μl
総量	50 μl

上記の反応系をPCR用サイクルサイクラーにてPCR反応を行った。  
 反応条件は、94℃2分、1サイクル、94℃15秒；60℃30秒；68℃5分、30  
 サイクルで行った。

反応後、PCR産物DNA断片を精製し、それぞれのプライマーに付加してある制限  
 酵素認識配列の制限酵素で消化を行った。

#### 【0057】

##### (2) ポリAセレクション法ベクター構築の場合

5' 側ホモロジーアーム用プライマー対 (Ku70 P2 AscI/Ku70 P3  
 NotI) のPCR産物DNA断片では、AscIとNotIの両制限酵素で消化を行  
 った。このDNA断片名をKu70 F2とした。

3' 側ホモロジーアーム用プライマー対 (Ku70 P4 NotI/Ku70 P  
 5 SalI) のPCR産物DNA断片では、SalIとNotIの両制限酵素で消化を  
 行った。このDNA断片名をKu70 F3とした。

##### (3) プロモーターレス法ベクター構築の場合

5' 側ホモロジーアーム用プライマー対 (Ku70 P2 SalI/Ku70 P  
 3 NotI) のPCR産物DNA断片では、SalIとNotIの両制限酵素で消化を  
 行った。このDNA断片名をKu70 F2Bとした。

3' 側ホモロジーアーム用プライマー対 (Ku70 P4 NotI/Ku70 P  
 5 AscI) のPCR産物DNA断片では、NotIとAscIの両制限酵素で消化を  
 行った。このDNA断片名をKu70 F3Bとした。

それぞれのDNA断片をpBCサブクローニング用ベクターにサブクローニングし、D  
 NA断片の両端部分のシーケンスを行ってKU70遺伝子を含むDNA断片であること  
 を確認した。

#### 【0058】

##### 5. ターゲッティングベクタープラスミドの構築

##### (1) ポリAセレクション法ベクター構築の場合

クローニングサイト改良pMC1DT-3上にKu70 F2、プロモーター付ピュー  
 ロマイシン耐性遺伝子、Ku70 F3の順になるようにDNA断片を挿入してポリAセ  
 レクション用ベクターを構築した。プラスミド名を pPAS-Ku70 PurOとし  
 た。

##### (2) プロモーターレス法ベクタープラスミド構築の場合

クローニングサイト改良pMC1DT-ApA上にKu70 F2B、プロモーター無  
 しポリAシグナル付ネオマイシン耐性遺伝子、Ku70 F3Bの順になるようにDNA  
 断片を挿入してポリAセレクション用ベクターを構築した。プラスミド名をpBDTA-



K u 7 0 n e o とした。

両ターゲティングベクタープラスミドともに制限酵素 A s c I で消化することによってプラスミド DNA の直線化を行った。

【 0 0 5 9 】

6. K U 7 0 遺伝子破壊細胞の選抜

(1) ポリ A セレクション法ベクターでの遺伝子破壊

上記 5 で作製した直線化 p P A S - K u 7 0 P u r o DNA を H C T 1 1 6 細胞にエレクトロポレーション法にて細胞に導入した。相同組換えによって K U 7 0 遺伝子が破壊された細胞を選抜するために、ピューロマイシン（最終濃度  $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）添加マッコイ 5 A 培地で培養をおこないコロニーを形成させた。得られた形質転換細胞コロニーをピックアップし、P C R 法およびサザンブロット解析により二つある K U 7 0 遺伝子座のうち一方の遺伝子座を破壊した細胞の選抜を行った。

(2) プロモーターレス法ベクタープラスミドでの遺伝子破壊

次に、一方の遺伝子座を破壊するために、直線化 p B D T A - K u 7 0 n e o を同様の方法で導入し、G 4 1 8（最終濃度  $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）添加マッコイ 5 A 培地で培養を行いコロニーを形成させ、先の（1）と同様の方法で形質転換細胞の解析を行い 2 つ目の遺伝子座も破壊された細胞株の選抜を行った。

【 0 0 6 0 】

7. 任意遺伝子の破壊効率 - H P R T -

ヒト細胞株 H C T 1 1 6 あるいは由来の k u 7 0 破壊細胞を用いて遺伝子破壊効率を調べるため H P R T（hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase）遺伝子破壊により効率を求めた。

H P R T は核酸前駆体合成のサルベージ経路で働く酵素なので、H P R T 遺伝子が破壊されても細胞の増殖に影響しないため、正確に遺伝子破壊効率を測定することができる。H C T 1 1 6 および由来の k u 7 0 破壊細胞にハイグロマイシン抵抗性遺伝子を有する H P R T 遺伝子破壊用のプラスミド DNA を導入し、得られたハイグロマイシン抵抗性クローンがどれくらいの割合で H P R T 遺伝子が破壊されているかを、P C R 法およびサザンブロッティング法で調べた。

H P R T 遺伝子破壊効率（遺伝子破壊細胞数／ハイグロマイシン抵抗性細胞数）

親株 H C T 1 1 6 : 6 / 1 2 0 ( 5 % )

k u 7 0 破壊細胞株 : 3 0 / 1 2 0 ( 2 5 % )

このように非常に高い効率で H P R T 遺伝子を破壊することができることから、k u 7 0 遺伝子破壊細胞株は、遺伝子破壊などの遺伝学的解析においてきわめて有用な細胞株であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 6 1 】

本発明により、自由にデザインした DNA を所望の細胞のゲノムの特定の位置に高い確率で組み込むことが可能となるため、精度の高い遺伝子改変技術を提供することができる。また、組み換え時に生じ得る不要な組み込みに対し、例えば、C r e / l o x を利用した切り出し系を開発が可能となることから、不要な組み込みを排除することもできる。その結果、特定の遺伝子を確実に導入し、該遺伝子を所望の細胞の中で安定に発現させることができる。また、特定の遺伝子を確実に破壊することも可能となる。従って、本発明に係る方法を用いることで、微生物を用いて食料等を生産する分野においては、容易に新品種の改良を実施することができるようになる。

また、本発明により、物質生産を阻害する遺伝子や、細胞毒素生産系に関与する遺伝子など、産業上利用可能な生物にとって不利益を及ぼす遺伝子の除去を容易に行うことができる。

さらに、本発明により提供される方法を高等動植物に応用することにより、動植物の品種改良はもとより、医療分野における創薬および遺伝子治療においても新たな技術の提供が期待できる。

## 【 0 0 6 2 】

## 参考文献

- Aronsonら, Mol. Gen. Genet. 242:490-494. 1994  
Ashら, Mol. Gen. Genet. 221:37-43. 1990  
Ausbel等, 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.  
Carter, 1986. Biochem J. 237:1-7  
CritchlowおよびJackson, TIBS, 23, 394-398. 1998  
Davisら, Methods Enzymol., 17:79-143. 1970  
Galaganら, Nature 422:859-868. 2003  
Handaら, Mol. Gen. Genet. 264, 154-163. 2000  
Inoueら, Mutat. Res., 125:185-194. 1984  
Kuwayamaら, Nucleic Acids Res., 30: E2. 2002  
Nickoloffら, In Nickoloff, J.A. and Hoekstra, M.F. (eds.), DNA Damage and Repair. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 335-362. 1998  
Orbach, M.J. Gene 150:159-162. 1994  
Pallら, Fungal Genet. Newslett., 40, 59-62. 1993  
Sambrookら, Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989  
Reissら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3358-3363. 2000  
Schroederら, Fungal Genet. Newslett. 42, 65-68. 1995  
Selker, E.U. Ann. Rev. Genet. 24, 579-613. 1990  
Stabenら, Fungal Genet. Newslett., 36:79-81. 1989  
Takitaら, Yeast 13:763-768. 1997  
Tamaruら, J. Bacteriol. 171:6288-6293. 1989  
Tomitaら, Mol. Gen. Genet., 238:225-233. 1993  
Vollmerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4869-4873. 1986  
Wachら, Yeast 10:1793-1808. 1994  
Walkerら, Nature 412:607-614. 2001  
Wells及びPowers. Gene. 34:315-23. 1985  
Wendlandら, Curr. Genet., 44:115-123. 2003  
YanezおよびPorter, Nucleic Acids Research., 30:740-748. 2002  
Zoller及びSmith 1987. Methods. Enzymol. 154:329-350

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 6 3 】

【図 1】 Hyg<sup>r</sup> で ncKU70 および ncKU80 を置換する方法を示す。Aは ncKU ターゲットベクターの構築法を示す。 ncKU 遺伝子の 5' 領域を (p-1) (配列番号 5) および (p-2) (配列番号 6) で増幅し、3' 領域を (p-3) (配列番号 7) および (p-4) (配列番号 8) で増幅した。 Hyg<sup>r</sup> 遺伝子は (p-5) (配列番号 9) および (p-6) (配列番号 10) で増幅した。Bは融合 PCR 産物の標的遺伝子への相同組込みを示す。

【図 2】 ncKu70 タンパク質の予想アミノ酸配列とヒト Ku70 タンパク質の予想アミノ酸配列との比較を示す。実線による枠内は、KU70/80 の DNA 結合ドメインを、破線による枠内は KU80 結合領域を、点線による枠内は SAP ドメインを示す。また、各種生物の Ku において特に保存されている領域 PHR は斜字体に下線を付して示した。

【図 3】 ncKu80 タンパク質の予想アミノ酸配列とヒト Ku80 タンパク質の予想アミノ酸配列との比較を示す。実線による枠内は、KU70/80 の DNA 結合ドメインを、破線による枠内は KU80 結合領域を、点線による枠内は DNA-PKcs 結合領域を示す。また、各種生物の Ku において特に保存されている領域 PHR は

斜字体に下線を付して示した。

【図 4】野生型および n c k u 7 0 および n c k u 8 0 株の UV および MMS 感受性を示す。白抜き三角は野生型、黒丸は n c k u 7 0、黒四角は n c k u 8 0 を示す。実験は少なくとも 3 回行い、各点はこれらのデータの平均値である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY

&lt;120&gt; Highly efficient gene targeting

&lt;130&gt; RJ007P41

&lt;160&gt; 30

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 609

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Ser Gly Trp Glu Ser Tyr Tyr Lys Thr Glu Gly Asp Glu Glu Ala  
1 5 10 15

Glu Glu Glu Gln Glu Glu Asn Leu Glu Ala Ser Gly Asp Tyr Lys Tyr  
20 25 30

Ser Gly Arg Asp Ser Leu Ile Phe Leu Val Asp Ala Ser Lys Ala Met  
35 40 45

Phe Glu Ser Gln Ser Glu Asp Glu Leu Thr Pro Phe Asp Met Ser Ile  
50 55 60

Gln Cys Ile Gln Ser Val Tyr Ile Ser Lys Ile Ile Ser Ser Asp Arg  
65 70 75 80

Asp Leu Leu Ala Val Val Phe Tyr Gly Thr Glu Lys Asp Lys Asn Ser  
85 90 95

Val Asn Phe Lys Asn Ile Tyr Val Leu Gln Glu Leu Asp Asn Pro Gly  
100 105 110

Ala Lys Arg Ile Leu Glu Leu Asp Gln Phe Lys Gly Gln Gln Gly Gln  
115 120 125



Lys Arg Phe Gln Asp Met Met Gly His Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Ser  
130 135 140

Glu Val Leu Trp Val Cys Ala Asn Leu Phe Ser Asp Val Gln Phe Lys  
145 150 155 160

Met Ser His Lys Arg Ile Met Leu Phe Thr Asn Glu Asp Asn Pro His  
165 170 175

Gly Asn Asp Ser Ala Lys Ala Ser Arg Ala Arg Thr Lys Ala Gly Asp  
180 185 190

Leu Arg Asp Thr Gly Ile Phe Leu Asp Leu Met His Leu Lys Lys Pro  
195 200 205

Gly Gly Phe Asp Ile Ser Leu Phe Tyr Arg Asp Ile Ile Ser Ile Ala  
210 215 220

Glu Asp Glu Asp Leu Arg Val His Phe Glu Glu Ser Ser Lys Leu Glu  
225 230 235 240

Asp Leu Leu Arg Lys Val Arg Ala Lys Glu Thr Arg Lys Arg Ala Leu  
245 250 255

Ser Arg Leu Lys Leu Lys Leu Asn Lys Asp Ile Val Ile Ser Val Gly  
260 265 270

Ile Tyr Asn Leu Val Gln Lys Ala Leu Lys Pro Pro Pro Ile Lys Leu  
275 280 285

Tyr Arg Glu Thr Asn Glu Pro Val Lys Thr Lys Thr Arg Thr Phe Asn  
290 295 300

Thr Ser Thr Gly Gly Leu Leu Leu Pro Ser Asp Thr Lys Arg Ser Gln  
305 310 315 320

Ile Tyr Gly Ser Arg Gln Ile Ile Leu Glu Lys Glu Glu Thr Glu Glu  
325 330 335

Leu Lys Arg Phe Asp Asp Pro Gly Leu Met Leu Met Gly Phe Lys Pro  
340 345 350

Leu Val Leu Leu Lys Lys His His Tyr Leu Arg Pro Ser Leu Phe Val  
355 360 365

Tyr Pro Glu Glu Ser Leu Val Ile Gly Ser Ser Thr Leu Phe Ser Ala  
370 375 380

Leu Leu Ile Lys Cys Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Cys Arg Tyr  
385 390 395 400

Thr Pro Arg Arg Asn Ile Pro Pro Tyr Phe Val Ala Leu Val Pro Gln  
405 410 415

Glu Glu Glu Leu Asp Asp Gln Lys Ile Gln Val Thr Pro Pro Gly Phe  
420 425 430

Gln Leu Val Phe Leu Pro Phe Ala Asp Asp Lys Arg Lys Met Pro Phe  
435 440 445

Thr Glu Lys Ile Met Ala Thr Pro Glu Gln Val Gly Lys Met Lys Ala  
450 455 460

Ile Val Glu Lys Leu Arg Phe Thr Tyr Arg Ser Asp Ser Phe Glu Asn  
465 470 475 480

Pro Val Leu Gln Gln His Phe Arg Asn Leu Glu Ala Leu Ala Leu Asp  
485 490 495

Leu Met Glu Pro Glu Gln Ala Val Asp Leu Thr Leu Pro Lys Val Glu  
500 505 510

Ala Met Asn Lys Arg Leu Gly Ser Leu Val Asp Glu Phe Lys Glu Leu  
515 520 525

Val Tyr Pro Pro Asp Tyr Asn Pro Glu Gly Lys Val Thr Lys Arg Lys  
530 535 540

His Asp Asn Glu Gly Ser Gly Ser Lys Arg Pro Lys Val Glu Tyr Ser  
545 550 555 560

Glu Glu Glu Leu Lys Thr His Ile Ser Lys Gly Thr Leu Gly Lys Phe  
565 570 575

Thr Val Pro Met Leu Lys Glu Ala Cys Arg Ala Tyr Gly Leu Lys Ser  
580 585 590

Gly Leu Lys Lys Gln Glu Leu Leu Glu Ala Leu Thr Lys His Phe Gln  
595 600 605

Asp

<210> 2  
<211> 732  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Arg Ser Gly Asn Lys Ala Ala Val Val Leu Cys Met Asp Val  
1 5 10 15

Gly Phe Thr Met Ser Asn Ser Ile Pro Gly Ile Glu Ser Pro Phe Glu  
20 25 30

Gln Ala Lys Lys Val Ile Thr Met Phe Val Gln Arg Gln Val Phe Ala  
35 40 45

Glu Asn Lys Asp Glu Ile Ala Leu Val Leu Phe Gly Thr Asp Gly Thr  
50 55 60

Asp Asn Pro Leu Ser Gly Gly Asp Gln Tyr Gln Asn Ile Thr Val His





Lys Lys Thr Trp Thr Val Val Asp Ala Lys Thr Leu Lys Lys Glu Asp  
275 280 285

Ile Gln Lys Glu Thr Val Tyr Cys Leu Asn Asp Asp Asp Glu Thr Glu  
290 295 300

Val Leu Lys Glu Asp Ile Ile Gln Gly Phe Arg Tyr Gly Ser Asp Ile  
305 310 315 320

Val Pro Phe Ser Lys Val Asp Glu Glu Gln Met Lys Tyr Lys Ser Glu  
325 330 335

Gly Lys Cys Phe Ser Val Leu Gly Phe Cys Lys Ser Ser Gln Val Gln  
340 345 350

Arg Arg Phe Phe Met Gly Asn Gln Val Leu Lys Val Phe Ala Ala Arg  
355 360 365

Asp Asp Glu Ala Ala Ala Val Ala Leu Ser Ser Leu Ile His Ala Leu  
370 375 380

Asp Asp Leu Asp Met Val Ala Ile Val Arg Tyr Ala Tyr Asp Lys Arg  
385 390 395 400

Ala Asn Pro Gln Val Gly Val Ala Phe Pro His Ile Lys His Asn Tyr  
405 410 415

Glu Cys Leu Val Tyr Val Gln Leu Pro Phe Met Glu Asp Leu Arg Gln  
420 425 430

Tyr Met Phe Ser Ser Leu Lys Asn Ser Lys Lys Tyr Ala Pro Thr Glu  
435 440 445

Ala Gln Leu Asn Ala Val Asp Ala Leu Ile Asp Ser Met Ser Leu Ala  
450 455 460

Lys Lys Asp Glu Lys Thr Asp Thr Leu Glu Asp Leu Phe Pro Thr Thr

465

470

475

480

Lys Ile Pro Asn Pro Arg Phe Gln Arg Leu Phe Gln Cys Leu Leu His  
485 490 495

Arg Ala Leu His Pro Arg Glu Pro Leu Pro Pro Ile Gln Gln His Ile  
500 505 510

Trp Asn Met Leu Asn Pro Pro Ala Glu Val Thr Thr Lys Ser Gln Ile  
515 520 525

Pro Leu Ser Lys Ile Lys Thr Leu Phe Pro Leu Ile Glu Ala Lys Lys  
530 535 540

Lys Asp Gln Val Thr Ala Gln Glu Ile Phe Gln Asp Asn His Glu Asp  
545 550 555 560

Gly Pro Thr Ala Lys Lys Leu Lys Thr Glu Gln Gly Gly Ala His Phe  
565 570 575

Ser Val Ser Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Thr Ser Val Gly Ser Val  
580 585 590

Asn Pro Ala Glu Asn Phe Arg Val Leu Val Lys Gln Lys Lys Ala Ser  
595 600 605

Phe Glu Glu Ala Ser Asn Gln Leu Ile Asn His Ile Glu Gln Phe Leu  
610 615 620

Asp Thr Asn Glu Thr Pro Tyr Phe Met Lys Ser Ile Asp Cys Ile Arg  
625 630 635 640

Ala Phe Arg Glu Glu Ala Ile Lys Phe Ser Glu Glu Gln Arg Phe Asn  
645 650 655

Asn Phe Leu Lys Ala Leu Gln Glu Lys Val Glu Ile Lys Gln Leu Asn  
660 665 670

His Phe Trp Glu Ile Val Val Gln Asp Gly Ile Thr Leu Ile Thr Lys  
675 680 685

Glu Glu Ala Ser Gly Ser Ser Val Thr Ala Glu Glu Ala Lys Lys Phe  
690 695 700

Leu Ala Pro Lys Asp Lys Pro Ser Gly Asp Thr Ala Ala Val Phe Glu  
705 710 715 720

Glu Gly Gly Asp Val Asp Asp Leu Leu Asp Met Ile  
725 730

<210> 3  
<211> 645  
<212> PRT  
<213> Neurospora crassa

<400> 3

Met Ser Trp Arg Lys Asp Gln Asp Glu Arg Leu Asp Gly Asp Glu Gly  
1 5 10 15

Asp Glu Glu Leu Asp Glu Asn Val Ser Tyr His Gln Ser Thr His Val  
20 25 30

Leu Phe Ala Ile Asp Val Ser Lys Ser Met Leu Lys Pro Pro Gln Asn  
35 40 45

Thr Gly Asp Lys Lys Ala Asp Lys Asp Ser Ala Leu Thr Ala Ala Leu  
50 55 60

Thr Cys Ala Tyr Gln Ile Met Gln Gln Arg Ile Ile Ser Gln Pro Lys  
65 70 75 80

Asp Met Met Gly Val Leu Leu Phe Gly Thr Glu Lys Ser Lys Phe Arg  
85 90 95

Asp Asp Ser Gly Asn Gly Thr Gly Tyr Pro His Cys Tyr Leu Leu Ser  
100 105 110

Asp Leu Asp Ile Pro Gly Ala Glu Asp Val Lys Lys Leu Lys Ala Leu  
115 120 125

Ile Glu Asp Gly Asp Asp Glu Asp Glu Ile Met Val Pro Ser Lys Glu  
130 135 140

Pro Val Ile Met Ser Asn Met Leu Phe Cys Ala Asn Gln Val Phe Thr  
145 150 155 160

Thr Asn Ala Ala Asn Phe Gly Ser Arg Arg Leu Phe Ile Val Thr Asp  
165 170 175

Asn Asp Asp Pro His Ala Gly Asp Lys Gln Ala Lys Ser Ser Ala Ala  
180 185 190

Val Arg Ala Lys Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Val Val Ile Glu Leu Phe  
195 200 205

Pro Ile Ser Arg Glu Asp Lys Lys Phe Asp Leu Ser Lys Phe Tyr Asp  
210 215 220

Asp Ile Ile Tyr Arg Asn Pro Ala Ala Glu Ala Gly Gln Ser Glu Ser  
225 230 235 240

Pro Lys Thr Ser Lys Ser Gly Asp Gly Leu Thr Leu Leu Asn Ser Leu  
245 250 255

Ile Ser Asn Ile Asn Ser Lys Gln Thr Pro Lys Arg Ser Tyr Phe Ser  
260 265 270

Asn Leu Pro Phe Glu Leu Ala Pro Gly Leu Thr Ile Ser Ile Lys Gly  
275 280 285

Tyr Met Pro Leu Asn Arg Gln Thr Pro Thr Arg Ser Cys Tyr Val Tyr  
290 295 300



Glu Gly Glu Glu Gln Ala Gln Val Val Gln Ser Glu Thr Ala Gln Val  
305 310 315 320

Asp Phe Ala Ala Arg Thr Val Glu Lys Ser Glu Leu Arg Lys Gly Tyr  
325 330 335

Lys Phe Gly Gly Glu His Ile Cys Phe Lys Pro Glu Glu Leu Ala Glu  
340 345 350

Leu Lys Gln Met Gly Lys Lys Thr Leu Arg Ile Ile Gly Phe Lys Lys  
355 360 365

Arg Ser Lys Ile Pro Ser Trp Ala Ser Val Lys Lys Ser Ile Phe Ile  
370 375 380

Phe Pro Ser Glu Glu Gln Tyr Val Gly Ser Thr Arg Val Phe Ser Ala  
385 390 395 400

Leu Trp Gln Lys Leu Leu Lys Asp Asp Lys Val Gly Ile Ala Trp Phe  
405 410 415

Val Ala Arg Glu Asn Ala His Pro Val Met Val Ala Ile Phe Pro Ser  
420 425 430

Gly Asn Pro Asp Asp Glu Glu Ala Asn Thr Pro Tyr Leu Pro Ala Gly  
435 440 445

Leu Trp Leu Tyr Pro Leu Pro Phe Ala Asp Asp Val Arg Ser Val Asp  
450 455 460

His Val Thr Ala Pro Pro Arg Pro Ala Asp Glu Leu Thr Asp Gln Met  
465 470 475 480

Arg Gln Val Ile Gln Asn Leu Gln Leu Pro Lys Ala Met Tyr Asp Pro  
485 490 495

Arg Lys Tyr Pro Asn Pro Ser Leu Gln Trp His Tyr Lys Ile Leu Gln  
500 505 510

Ala Lys Ala Leu Asp Glu Glu Thr Pro Asp Ala Met Asp Asp Val Thr  
515 520 525

Leu Pro Lys Tyr Arg Gln Ile Asp Lys Arg Val Gly Gly Tyr Leu Ala  
530 535 540

Glu Trp Lys Glu Met Leu Ala Lys Lys Ala Asn Asp Leu Gln Asn Thr  
545 550 555 560

Arg Ala Phe Lys Arg Glu Phe Glu Glu Asp Asp Glu Arg Pro Ala Lys  
565 570 575

Arg Ala Lys Pro Ser Lys Lys Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly Pro Ala  
580 585 590

Asn Ser Asn Ala Asp Leu Lys Lys Ala Phe Glu Gln Gly Thr Leu Gly  
595 600 605

Lys Met Thr Val Ala Glu Leu Lys Asp Ile Met Ala Ser Lys Gly Ile  
610 615 620

Ser Thr Ala Gly Arg Lys Ala Glu Leu Val Glu Arg Leu Glu Gln Trp  
625 630 635 640

Val Glu Glu Asn Leu  
645

<210> 4  
<211> 661  
<212> PRT  
<213> Neurospora crassa

<400> 4

Met Ala Asp Lys Glu Ala Thr Val Tyr Val Ile Asp Leu Gly Glu Ser  
1 5 10 15

Met Ala Asp Cys His Asn Gly Arg Asn Glu Ser Asp Leu Glu Phe Gly

20

25

30

Met Arg Tyr Ile Trp Asp Lys Ile Thr Thr Thr Val Ala Ala Ser Arg  
35 40 45

Lys Thr Trp Asn Val Gly Val Val Gly Leu Asn Thr Asp Glu Thr Asn  
50 55 60

Asn Asn Glu Asn Arg Glu Glu Tyr Gln Gly Tyr Glu Asn Ile Ser Val  
65 70 75 80

Leu Gln Glu Leu Gly Pro Met Thr Met Ala Ser Leu Arg Ala Leu Lys  
85 90 95

Ser Lys Ile Glu Pro Ser Ser Thr Ser Ser Ala Asp Ala Ile Ser Ala  
100 105 110

Ile Val Val Ala Leu Arg Met Ile Gln Thr Phe Thr Lys Lys Leu Lys  
115 120 125

Tyr Lys Arg Lys Ile Ile Val Val Thr Asn Gly Glu Ser Pro Ile Asp  
130 135 140

Asp Asp Gln Ser Glu Glu Val Ala Asn Met Leu Asn Asp Val Gly Ile  
145 150 155 160

Glu Leu Ile Val Leu Gly Val Asp Phe Asp Asp Ala Glu Tyr Gly Phe  
165 170 175

Lys Glu Glu Asp Lys Pro Arg His Lys Glu Gln Asn Glu Lys Ile Leu  
180 185 190

Lys Thr Leu Val Asp His Cys Glu Ser Gly Ala Phe Gly Thr Met Ala  
195 200 205

Gln Ala Val Glu Glu Leu Ala Thr Pro Arg Ile Lys Ser Val Arg Pro  
210 215 220

Phe Lys Ala Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Leu Gly Asp Pro Gln Lys Tyr  
225 230 235 240

Pro Ser Ala Leu Ser Ile Gln Val Glu Arg Tyr Phe Lys Thr Lys Arg  
245 250 255

Ala Thr Pro Pro Ser Ala Ser Asn Val Ala Asn Pro Asn Gly Pro Pro  
260 265 270

Gln Thr Gln Val Trp Asn Glu Asp Asp Gly Val Pro Phe Ser Gly Val  
275 280 285

Gly Leu Gln Pro Val Lys Gln Leu Arg Thr Tyr Arg Ile Glu Asp Ser  
290 295 300

Lys Ala Ala Gly Gly Lys Lys Asp Val Asp Met Glu Asp Leu Ala Lys  
305 310 315 320

Ala Tyr Gln Tyr Gly Arg Thr Val Val Pro Phe Gly Lys Ser Glu Glu  
325 330 335

Asp Tyr Leu Lys Tyr Glu Thr Thr Lys Ser Phe Thr Ile Ile Gly Phe  
340 345 350

Val Pro Met Ser Ser Tyr Glu Pro Phe Leu Asn Met Gly Glu Thr Gly  
355 360 365

Leu Ile Val Ala Gln Lys Val Asn Glu Glu Ala Glu Leu Gly Leu Ser  
370 375 380

Ala Leu Ile His Ala Leu His Glu Leu Glu Ser Tyr Ala Val Ala Arg  
385 390 395 400

Tyr Val Asn Lys Asp Lys Ala Pro Pro Gln Ile Leu Leu Leu Lys Pro  
405 410 415

Asn Pro Ala Ile Glu Asp Asp Ile Glu Cys Leu Tyr Asp Ile Pro Leu



420

425

430

Pro Phe Ala Glu Asp Val Arg Ser Tyr Gln Phe Pro Pro Leu Asp Lys  
435 440 445

Val Leu Thr Ile Thr Gly Asn Val Leu Thr Glu His Arg Leu Leu Pro  
450 455 460

Asn Asn Asp Leu Gln Gln Ala Met Ser Asp Tyr Val Asp Ala Met Asp  
465 470 475 480

Leu Thr Glu Tyr Gly Gln Asp Asp Asp Gly His Pro Ala Glu Tyr Ala  
485 490 495

Pro Ile Asp Asp Leu Tyr Asn Pro Val Ile His His Met Asn Gln Ala  
500 505 510

Ile Arg Asn Arg Ala Val Asn Pro Asp Ala Pro Leu Pro Pro Val Ala  
515 520 525

Glu Ile Leu Thr Arg Phe Thr His Pro Pro Glu Pro Leu Leu Ala Lys  
530 535 540

Ala Lys Thr Glu Ile Asp Gly Leu Ile Gln Ala Ala Glu Val Lys Lys  
545 550 555 560

Ala Glu Asp Asp Glu Thr Ile Glu Ile Ala Ala Lys Gln Met Gly Asn  
565 570 575

Ile Ile Cys Lys Leu Val Ser Asp Ser Phe Ala Asp Val Leu Tyr Pro  
580 585 590

Arg Ala Ala Glu Asn Leu Arg Val Met Arg Glu Glu Leu Ile Asn Met  
595 600 605

Glu Val Pro Thr Leu Tyr Asn Lys Tyr Ile Thr Lys Leu Lys Glu Ser  
610 615 620

Leu Leu Ser Val Ser Glu Ser Lys Ser Met Gly Gly Ser Leu Thr Gly  
625 630 635 640

Ser Gly Glu Asp Thr Asp Glu Glu Arg Gln Arg Lys His Pro Phe Ser  
645 650 655

Ala Gln Glu Val Gly  
660

<210> 5  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 5  
gtgctgtagc cgttttgggt atcgc

25

<210> 6  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 6  
ggcgtaatag cgaagagata gttgctggaa ataa

34

<210> 7  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 7  
aagcataaag tgtaaaggct tgttgatgac cgt

33

<210> 8

<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 8  
ttggacgccg cacacctctc gctct

25

<210> 9  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 9  
ttatttccag caactatctc ttcgctatta cgcc

34

<210> 10  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 10  
cacggtcatc aacaagcctt tacactttat gctt

34

<210> 11  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 11  
gcgccgggag gttgttcgta agctg

25

<210> 12  
<211> 34  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed nucleotides

<400> 12

ggcgtaatag cgaagaggct tttcggcttt gctg

34

<210> 13

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed nucleotides

<400> 13

aagcataaag tgtaaagcag ggttggagac aggt

34

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed nucleotides

<400> 14

aaggcggagt tgttggctgc gaagg

25

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed nucleotides

<400> 15

cagcaaagcc gaaaagcctc ttcgctatta cgcc

34

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed nucleotides

&lt;400&gt; 16

acctgtctcc aaccctgctt tacactttat gctt

34

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed nucleotides

&lt;400&gt; 17

gagaactgat catgcgatgc gtggc

25

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed nucleotides

&lt;400&gt; 18

cattcgcttg atcgacatgg ttggc

25

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed nucleotides

&lt;400&gt; 19

cacattgtcc aagcttactg tggctaccc

29

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed nucleotides

<400> 20  
gggtagccac agtaagcttg gacaatgtg

29

<210> 21  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 21  
cacattgtcc aagcttactg tggctaccc

29

<210> 22  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 22  
gggtagccac agtaagcttg gacaatgtg

29

<210> 23  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 23  
gctataggcg cgcctctgca tttaaggaga gaatagctgt g

41

<210> 24  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Designed nucleotides

<400> 24

agaacagcgg ccgcaagaga tctcgatcac tgcttatgat c

41

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed nucleotides

&lt;400&gt; 25

ctttaggcgg ccgcaattca agatgagtca taagaggatc

40

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed nucleotides

&lt;400&gt; 26

catgtcgaca tttcaagaca ggtgaagagg tgacaag

37

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed nucleotides

&lt;400&gt; 27

gctatagtcg actctgcatt taaggagaga atagctgtg

39

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed nucleotides

&lt;400&gt; 28

agaacagcgg ccgcaagaga tctcgatcac tgcttatgat c

41

<210> 29  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Designed nucleotides

<400> 29  
 ctttaggcgg ccgcaattca agatgagtca taagaggatc

40

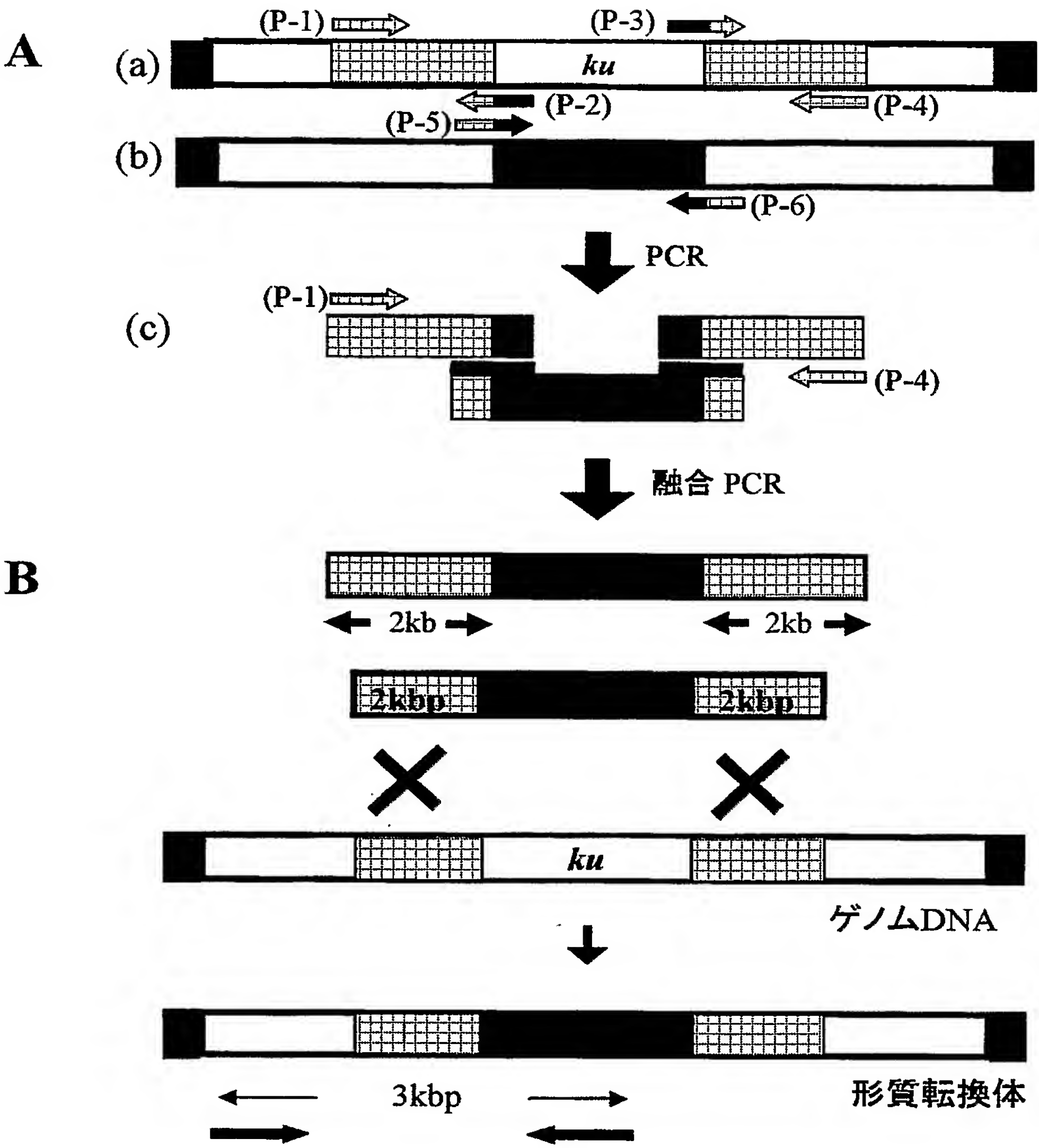
<210> 30  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Designed nucleotides

<400> 30  
 atcgcaggcg cgccagacag gtgaagaggt gacaagatac

40

【書類名】 図面  
【図 1】





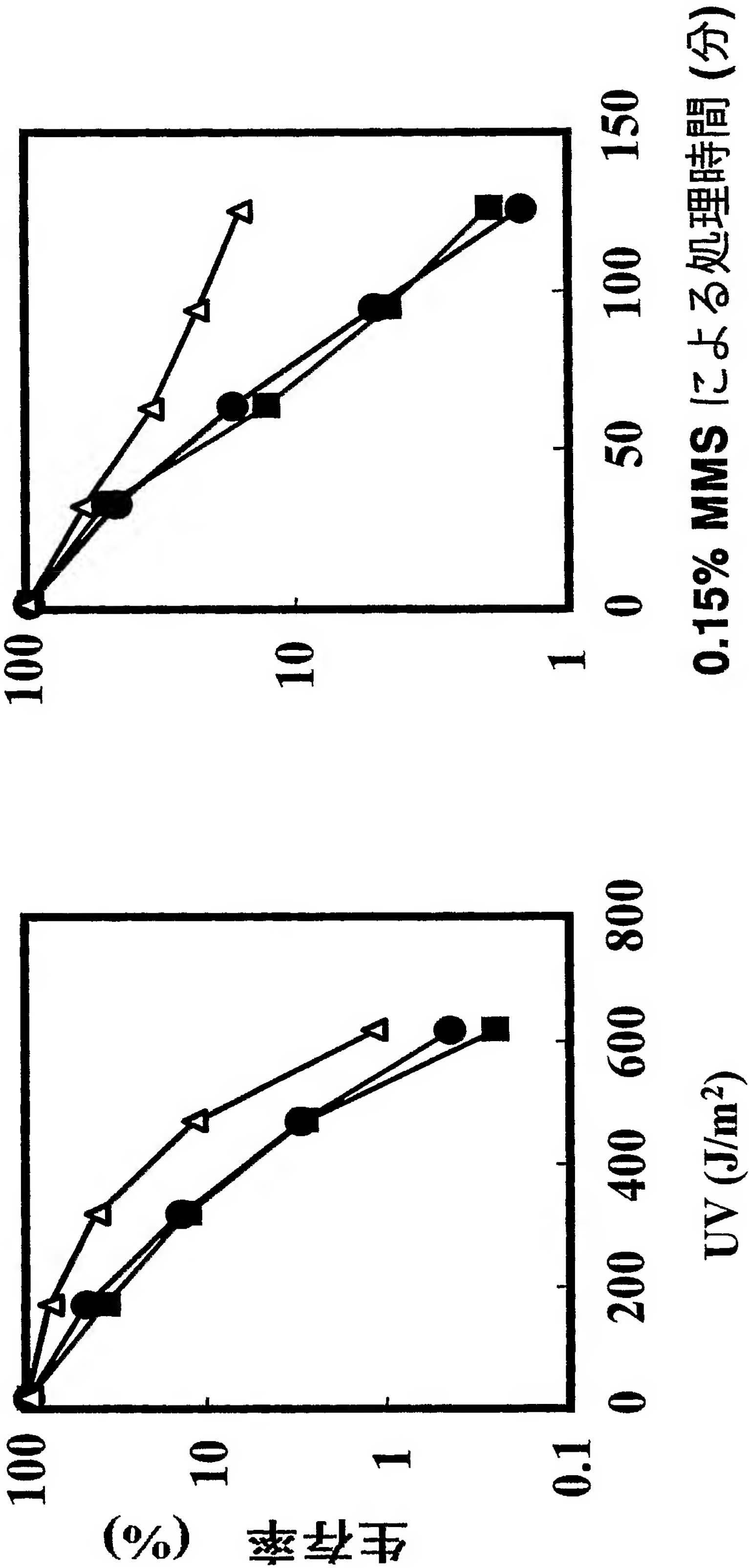
【図 2】

NCKU70	1	MSWRKDQDERLDGSECEDELDENVSYHQSTHVLFAIDSKSLKPPQNTG	
KU70	1	MSGWESYKTEGDDEEAGEEQUEENIEASGDYKYSGRDSIFLDASKAMFE	PHR1
NCKU70	51	DKKADKDALTAATCAYQMOQIISQPDVLGTEKSKFRDDSG	
KU70	51	SQSEDEL PFDMSOCIQSYISIISSDVLFGTEKD-----K	PHR2
NCKU70	101	NGTGYPHCYLLSDLDIPGAEDVKKLKALIED-GDDEDEIMVPSKEPVIMS	
KU70	95	NSVNEKNIIYVLOELDNPGAKRILELDQFKGQQGQKRFQDMGHGSDYSIS	
NCKU70	150	NMLECANOVETNAANFGSRRIETVTDNDDPHAGDKQAKSSAAVRAKDLY	
KU70	145	EVLWVCANLEFSDVQFKMSHKRIMFTNEDNPHGNSAKASRARTKAGDLR	
NCKU70	200	DLGVVIELFPISREDKKFDLSKFYDDIIYRNPAAEAGQSESPKTSKSGG	
KU70	195	DTGIFEDLMHKKKPGG-FDISLFYRDIIS-----IAEDEDLRVHFEE	
NCKU70	250	LILLNSLISNINSKQTPKRSYFSNLPFELAPGITISIKGYMPIINRQTPTR	
KU70	236	SSKLEDILRKVRAKETRR-ALSRLKLLKNKDEVISVGIYNLVOKALKPP	
NCKU70	300	SCYVYEGEEQAQVVQSETACVDFAARTVEKSELRRGYKEGGEHICFKPEE	
KU70	285	PIKLYRETNEPVKTKORIENTSTGC-LILPSDTKRSQIYGSROIILEKEE	
NCKU70	350	LAEIKOMGKKTLRIGFKKRSKPSWASKSFPSEEQYGSFVFS	
KU70	334	TEELKRFDDPGLIMGEKPLVLKKHHYPSFPPEESLVGSTFS	
NCKU70	400	ALWOKILKDKVAVARENAEPVMVAEPGSGNPDDDEANTPYLPAGL	
KU70	384	ALLIKCLEKVAACRTPRRNIPPYEVAVEQEEELDQK-IQVTPPGF	PHR3
NCKU70	450	WLYPLPFADDVRSVDHVTAPPRPADELTDOMROVTIONLQLPKAMYDPRKY	
KU70	433	QVELPFADDKR-KMPFTEKIMATPEQVGKMKATVEKLRFT---YRSDS	PHR4
NCKU70	500	PNPSLQWHILQAKALDEETPDAMDDVTLPKYRQIDKRVGGYFAEWKEM	
KU70	479	ENPVLOQHNTAALALDIMEPEQAVDTLPKVEAMNKRIGSLVDEEFKEI	PHR5
NCKU70	550	PAKKANDLQNTAFKREFEEDDERPAKRAKPSKKAASGGGGPANSNADLK	
KU70	529	VYPPDYNPE-----GK-----VTKRKHDNEGSGSKRPKVEYSEEELK	
NCKU70	600	KAFAQGTILGKMTVAELKDIMASKGISTAGRKAEIVERLEQWVEENL	
KU70	566	THISKGTILGKFTVPMLEACRAYGLKSGELKKOELLEALTKEFQD-	

【図 3】

NCKU80	1	---MID EATVYV DICE MADCHNCRNESDIEFEM YIWDK TTTVAAS
KU80	1	MVRSNKAAVVLCDIGFMSNSIPG-IESPFEO K VITME QRQVFAE
		PHR1
NCKU80	48	RKTWN VGLNIDEINNNENREEYQGYENISVLQELGPMTMASIRA KS
KU80	50	NKDE- VLEGTGIDNPLSGG--DOYONITVHRHMLPDEFLLIED ES
		PHR2
NCKU80	98	KIEPSSTSSADAI SATVVALRM IQTFTKKLKYKRKTI VTINGESPIDDDQ
KU80	97	KIQPGSQQADFLDALIVSMDV QHETIGKKFEKRHIETFDLSSRFSKSQ
NCKU80	148	SEEVANMLNDVGIELIVLGVDFFDAEYGFKEEDKPRHEQNEKILKTLVD
KU80	147	LEI IHSLLKKCDISLQFFLPFSLGKEDCSGDRGDGPFR LGHGSPSFPLKG
NCKU80	198	HCESGAFGTMAQAVEEATPRIKSVRPFKANDGPLTLGDPQKYP SALSISIQ
KU80	197	ITEQQKEGLEIVKMVMISLEGEDGDEIYSSESRLKLCVFKKIERHSH
NCKU80	248	VERYFKTKRATPPSASN VANPNGPQTQVWNEDDEVFSGVGLQPVKQLR
KU80	247	WPCRLTIGSNLSIRIAAYKSILQERVKKTWTVVDAKTLK---KED QKET
NCKU80	298	TYRLED SKAAGGKKD VDMEDIAKAYQYGRTVVPFGKSEEDYLKYET-KS
KU80	294	VYCI NDD----DETEVLKEDI IQGFRYGSDIVPFSKVDEEOMKYKSEGKC
NCKU80	347	F GEVPMSSYEPFLNMG-ETGL VAO VNEEAE LSALIHAE L S
KU80	340	F GECKSSQVQRRFFMGNQVLK FAA DDEAAA LSSLIHALD L M
NCKU80	396	YA ARYVNKD APPQ L LKPNPAIEDDIECTLYD PLPFAED RSYQEP-
KU80	390	VA VRYAYDK ANPO G AFE--EIKHNYECLVY QLPFEMED ROYMESS
		PHR3 PHR4
NCKU80	445	-----PLDKVLTITGNVITEHRLPNNDLQQAMSDYVDAMD TEYGO
KU80	438	LKNSKKYAPTEAQLNAVDATD SMSLAKKDEKTDTEEDLEP TTK PNPRF
NCKU80	487	D-----DDGHPAEYAP-----IDDLYNP-----VIHHMNQAIRN
KU80	488	QRLFOCLLHRAIHREPIEPIQQHIWNMLNPPEAEVTTKSQPLSKIKTLF
		PHR5
NCKU80	516	RAVNPDAPLPVVAEILTRFTHPPEPLAKAKTEIDG-----LIQAA
KU80	538	PLIEAKKKDQVTAQELFQDNHEDGPTAKKLTQGGCAHFSVSSLAEGSVT
NCKU80	557	EVKKAEDDETIETAAKQMGN-----IICKLVSDSEFADVLYPRAAE
KU80	588	SVGSVNPAENFRVLVKQKKASFEEASNQLINHIEQFLDINETPYEMKSID
NCKU80	597	NIRVMREELINMEVPTLYNKNITKLKESILSVSESKSMGGSTGSGEDTD
KU80	638	CIRAFREEATKFSEEQRNNELKALOEKVEIKQLNFWEIFVQDGITLIT
NCKU80	647	EERQRKHPPFSAQEVG-----
KU80	688	KEEASGSSVTAEEAKKFLAPKDKPSGDTAAVFEEGGDVDDLDMI

【図 4】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 所望の細胞において、相同組換え率を顕著に促進させる新規方法を提供する。

【解決手段】 真核生物細胞等の所望の細胞の相同組換え率を上昇させるために、非相同組換えに必要な因子、例えば、Ku70、Ku80をコードする遺伝子に突然変異を導入し、または該遺伝子を破壊することにより、機能喪失を引き起こしたとき、細胞に外来性DNAを、電気ショック法等により導入して相同組換えを行わせ、細胞の相同組換え頻度を促進させる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 5 2 9 5 2
受付番号	5 0 4 0 0 3 1 9 2 4 2
書類名	特許願
担当官	第二担当上席 0 0 9 1
作成日	平成 1 6 年 5 月 6 日

< 認定情報・付加情報 >  
【提出日】 平成16年 2月27日



特願 2 0 0 4 - 0 5 2 9 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 3 3 6 0 1 1 5 ]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由] 新規登録

住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構